

学校编码: 10384

分类号 R683 密级 公开

学号: 24520081153447

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

皮质骨来源成骨细胞复合异种脱蛋白骨
修复兔桡骨骨缺损的实验研究

Repair of Rabbit Radial Defect Model Using a Composite
Based on Cortical Bone-derived Osteoblasts with
Xenogenic DPB Scaffold

程高建

指导教师姓名: 练克俭 教授

陈长青 副主任医师

专 业 名 称: 外科学 (骨科方向)

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

皮质骨来源成骨细胞复合异种脱蛋白骨修复兔桡骨缺损的实验研究

程高建

指导教师

练克俭
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(陈长青,成骨细胞复合异种脱蛋白骨构建组织工程骨)课题(组)的研究成果,获得(南京军区“十一五”重点计划课题[编号06Z29]和福建省青年科技人才创新项目[编号2004F3146])课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学材料学院生物工程中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
主要英文缩写词表	V
引言.....	1
实验材料.....	3
实验方法.....	9
实验结果.....	16
讨论.....	22
结论.....	33
致谢.....	34
参考文献.....	35
附图.....	43
攻读学位期间的研究成果	54
综述.....	55

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
English abbreviation Vocabulary	V
Introduction	1
Experiment Materials	3
Experiment Methods	9
Experiment Results	16
Discussion	22
Conclusion	33
Acknowledgement	34
Reference	35
Appendix	43

摘 要

本课题前期实验已证实皮质骨来源的成骨细胞成分更纯，表型更稳定，且可采取连续植块培养法获取大量成骨细胞；同时体外生物相容性试验证实自制小牛异种脱蛋白骨（下文统称异种脱蛋白骨）具有良好的生物相容性。本实验在前期实验的基础上，以皮质骨来源成骨细胞为种子细胞，以异种脱蛋白骨为支架材料，体外构建组织工程骨，作为自体骨替代材料行修复兔四肢骨缺损的实验。本文包括以下内容：

目的：探讨异种脱蛋白骨（deproteinized bone,DPB）复合皮质骨来源成骨细胞修复兔桡骨临界骨缺损的效果。

方法：48 只成年雌性新西兰大白兔的一侧桡骨均建立 1.5cm 的临界骨缺损模型，随机分为 A，B，C，D 四组：A 组植入已经在体外共同培养 7 天的异种脱蛋白骨与成骨细胞的复合材料；B 组植入自体髂骨；C 组植入单纯异种脱蛋白骨材料；D 组作为空白对照组。术后进行以下检测：（1）X 线观察（术后 4、8、12 周）、（2）血液 C 反应蛋白检测（术后 1 天、3 天、1 周、2 周）、（3）标本大体观察（术后 12 周）、（4）骨密度测量（术后 12 周）、（5）生物力学测试（术后 12 周）、（6）组织形态学观察（术后 12 周）。通过以上指标综合评价各实验组骨缺损的修复效果。

结果：（1）X 线显示：术后 4 周，A 组有散在的密度增高影；B 组自体骨吸收明显，断端增殖明显；C 组桡骨断端明显。术后 8 周，A 组支架材料与桡骨两断端基本融合，支架材料所在区域密度不均；B 组桡骨两断端基本融合，骨缺损区仍有部分没有完全修复；C 组支架材料有密度增高影，桡骨断端没有愈合。术后 12 周 A 组植入材料已经与桡骨两断端融为一体，骨折线消失并开始重塑。B 组自体骨移植的髂骨与桡骨两断端基本融合，塑形完成。C 组可见少量骨形成，材料明显吸收，但骨折线没有消失。D 组骨缺损未修复。（2）C 反应蛋白测试

摘要

显示各实验组动物术后 CRP 均有升高,并随时间逐渐降低,各组数据差异无统计学意义。(3) 术后 12 周标本大体观察显示: A、B 组植入体与桡骨两断端愈合牢固; C 组支架材料只有部分降解,桡骨断端界限清晰; D 组骨缺损明显,由软组织填充。(4) 术后 12 周骨密度测量及新骨生成均显示 A 组数据低于 B 组,但明显高于 C 组 ($P < 0.05$)。(5) 术后 12 周生物力学测试显示 A 组的最大抗折载荷明显高于 C 组 ($P < 0.05$),且接近于 B 组数据。(6) 术后 12 周组织学观察显示: A 组骨缺损区大量新生骨生成, B 组已经基本实现髓腔再通, C 组仅有少量新生骨形成, DPB 微孔间充满纤维结缔组织, D 组仅见纤维结缔组织。

结论: 皮质骨来源成骨细胞复合异种脱蛋白骨可以安全高效修复兔桡骨临界骨缺损。

关键词: 成骨细胞; 脱蛋白骨; 临界骨缺损。

Abstract

Compared with autogenous bone and synthetic materials, deproteinized bone have a wide variety of sources, lower cost and the closest biological three-dimensional structure of bone and other advantages, as a substitute repairing bone defect has great potential. However, deproteinized bone as scaffold for tissue engineering need to focus on solving the immune rejection after transplantation, material absorption and osteoinductivity. In this study, cortical bone-derived osteoblasts as seed cells, deproteinized bovine bone as tissue engineering scaffold as bone substitute materials repairing segmental bone defects.

Objective: To evaluate the efficiency of xenogenic DPB based on cortical bone-derived osteoblasts as an alternative in repair of critical bone defect.

Methods: A total 48 adult female Newzealand rabbits were divided into group A, B, C, D at random. For all rabbits, 1.5cm critical bone defect was created in one side of radius. The critical-size defect was filled with a DPB scaffold seeded with cortical bone-derived osteoblasts in vitro (group A), autograft (group B) and unseeded DPB scaffold (group C). A empty defect served as the control group (group D). At the 4th, 8th and 12th week after operation, all specimens of each group were selected for

(1) X-ray, (2) CRP measurements at the 1st day, 3rd day, 1st week and 2th week after operation and at 12th week after operation for (3) gross samples observation, (4) histological observation, (5) bone mineral density (BMD) measurements, (6) biomechanical test. The effect of repairing were generally assessed through these measurements.

Results: (1) X-ray showed: After 4 weeks, a scattered increasing density image in group A; autologous bone resorption and proliferation of radial stump was significant in group B; an obvious radial fracture in group C. After 8 weeks, the basic integration of the two ends and scaffold, density inequality in group A; the two ends of radial

摘要

basic fusion, bone defect was not fully repaired in group B; the higher density of scaffold region and unhealed radius ends in group C. After 12 weeks, scaffold had been integrated with the ends, two radial fracture line disappeared and started remodeling in group A. Basic integration of the two radial ends and iliac autograft, shaping completed in group B. A small amount of bone formation, material was absorbed, but the fracture line did not disappear in group C. Bone defect was not repaired in group D. (2) CRP testing showed: CRP of all groups increased and decreased gradually after operation. (3) Gross samples observation at 12th week showed: a solid healing of graft and radial stumps in group A, B; only a portion of scaffold degraded and the stumps were still clear in group C; bone defect was augmented by soft tissue in group D. (4) Histological observation showed: the abundant of newly bone formation in group A, the medullary cavity recanalized in group B, a small amount of newly bone formation, mostly the fibrous connective tissue in group C, only the fibrous connective tissue in group D. (5) BMD measurements showed that at 12th week the BMD of group A was close to the that of group B and significantly higher than that of group C and D ($p<0.05$). (6) Biomechanical testing showed: the maximum bend load of group A and B was significantly higher than that of group C ($p<0.05$).

Conclusion: Radial critical bone defect could be repaired efficiently by xenogenic DPB based on cortical bone-derived osteoblasts.

Keywords: Osteoblasts; Deproteinized bone; Critical-size bone defect.

主要英文缩写词表

主要英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
DPB	Deproteinized bone	脱蛋白骨
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
SEM	Scanning electron microscope	扫描电镜
AKP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
OB	Osteoblasts	成骨细胞
Kg	Kilogram	千克
OC	Osteocalcin	骨钙素
HE	Hematoxylin and Eosin	苏木素和伊红
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸缓冲液
SPSS	Statistics Package For Social Science	社会科学统计软件包
CRP	c-reactive protein	C-反应蛋白
BMD	Bone mineral density	骨密度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
mg	Milligram	毫克
μg	Microgram	微克
μm	Micrometer	微米

引言

因外伤、骨肿瘤切除、感染以及先天畸形引起的四肢节段性骨缺损在临床上非常常见。骨移植手术是临床中仅次于输血最常见的组织移植术，每年在美国有50万例，在全球超过200万例骨移植应用于骨科、神经外科等领域^[1]。长期以来，骨缺损修复的材料来源主要为自体骨、异体骨及人工合成材料，其中自体骨移植被视为骨缺损修复的“金标准”。但自体骨来源有限，无法对大节段骨缺损提供足量的自体骨，并发症发生率高，此外在修复骨缺损过程中还可能导致骨骼生物力学特性的丧失^[2]。同种异体骨来源也非常有限。异种骨移植可避免自体骨移植造成的供区损伤、疼痛等并发症，但异种骨移植容易发生免疫排斥反应、炎症反应及潜在感染。经去抗原处理后的异种骨虽然免疫排异反应得到减弱或消失，但自身成骨作用和骨诱导活性遭到严重削弱^[3,4]，同时也存在传播疾病的危险^[5]。人工合成材料在制作流程、生物相容性等方面存在诸多困难，而且多数人工合成材料仅有促成骨作用，无骨诱导作用。而三维结构、孔径、孔隙率与自体骨最为接近的异种骨生物衍生材料显然具有巨大的优势。因此，科研工作者试图寻找一种方法在尽可能保留异种骨生物力学及骨诱导性的同时，避免或减少异体骨移植所引起的免疫排斥反应和炎症反应，进而提高四肢节段性骨缺损修复的成功率。

随着近年来生物技术的发展，特别是骨组织工程的发展为解决异种骨移植在实际应用中保留生物力学和骨诱导特性同时克服免疫排斥反应和炎症反应提供了有效的方法。所谓骨组织工程，就是将分离后的高浓度的成骨细胞、骨髓基质细胞等组织细胞，经体外培养扩增后种植于一种天然的或人工合成的，具有良好生物相容性并可被人体逐步降解吸收的细胞支架上，然后将这种细胞生物材料复合体植入骨缺损部位^[6]。在生物材料逐步降解的同时，种子细胞不断增殖并分泌骨基质，促进新骨生成从而达到修复骨缺损的目的。

骨组织工程的研究主要包括三个方面的内容^[7]：①细胞外基质替代物即支架材料的研究；②成骨细胞等种子细胞的培养和生长的研究；③组织工程人工骨在骨缺损治疗方面的研究。

理想的骨组织工程支架材料应当具有良好的成骨性、骨诱导性、骨传导性、

生物相容性和生物可吸收性，临床应用可提供结构支持并且造价低廉^[8]。异体骨生物衍生材料经过几十年的研究，技术已然成熟，已有商品化生产并投入临床应用^[9,10]。但是同种异体骨存在着来源有限、传播疾病及伦理问题等缺点。异种骨具有同种异体骨相同的骨小梁结构，而且异种骨取材广泛，价格低廉，作为植骨生物材料有着巨大的潜在价值^[11]。经过脱脂脱蛋白处理的异种脱蛋白骨，其抗原性和成骨能力分离，被认为是解决自体骨与同种异体骨来源不足的有效方法^[12]。其中过氧化氢乙醚法制备的脱蛋白骨组织相容性和生物力学性能都比较好^[13]。解放军第一七五医院全军骨科中心自 1991 年起选用牛长骨干骺端松质骨，采用双氧水、乙醚脱蛋白和脱脂后，制成异种脱蛋白骨，经动物实验和 3000 余例临床应用表明该材料具备与人体骨组织相似的三维结构，更符合骨修复的生理要求，而且生物相容性和骨传导作用良好，具有来源广、制作简单、成本低等人工合成材料难以比拟的优势，可作为骨组织工程较为理想的支架材料。

此外，选择适宜的种子细胞也是骨组织工程成功修复骨缺损的关键。骨组织工程种子细胞应满足以下几个要求：第一，具有成骨能力；第二，易于分离培养，体外扩增快；第三，细胞生物特性稳定，经连续传代后，仍保持成骨能力；第四，取材方便，对机体损伤小^[14]。目前国内多数研究者选用骨髓基质细胞和骨膜间充质干细胞作为种子细胞，但以上细胞存在细胞成分混杂以及细胞连续传代后成骨细胞表型漂移等缺点^[15,16]。国内外也有很多文献报道选用脂肪干细胞定向诱导作为骨组织工程的种子细胞^[17,18]，但是该方法存在着细胞分离纯化和定向诱导等困难。本课题前期实验已证实皮质骨来源的成骨细胞成分更纯，表型更稳定，且可采取连续植块培养法^[19]获取大量成骨细胞；同时体外生物相容性试验证实自制异种脱蛋白骨与成骨细胞具有良好的生物相容性。

本课题系南京军区“十一五”计划重点课题（编号06Z29）和福建省青年科技人才创新项目的子课题（编号2004F3146）。实验过程均在厦门大学生物医学工程研究中心实验室（福建省重点实验室）进行。本实验在前期实验的基础上，以皮质骨来源成骨细胞为种子细胞，以脱蛋白骨为支架材料，体外构建组织工程骨，行修复兔桡骨缺损的实验。采用影像学、组织学、生物力学及免疫反应监测等方法综合评价桡骨骨缺损的修复效果，以期四肢骨缺损骨移植替代物的选择提供理论依据。

实 验 材 料

1.1 实验动物及实验地点

雌性新西兰大白兔（6周龄，体重0.5kg）1只，雌性骨骼发育成熟新西兰大白兔（9~12月龄，体重2.5~3kg）48只，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，动物合格证明书：医动字第04-54-4号，许可证号：SCXK（沪）2007-0011。

本实验在厦门大学材料学院生物医学工程研究中心完成，实验室内配备有标准的细胞培养实验间及专用的动物实验室。

1.2 支架材料

按文献报道的方法^[20] 将6月龄的小牛下肢长骨干骺端松质骨与骨干纵向锯开，除去骨髓，生理盐水反复冲洗，制成0.4cm×0.4cm×1.5cm大小骨块共24块，将松质骨骨块置于20%双氧水中在37℃水浴箱孵育，脱蛋白72h，每24h更换双氧水1次，完成脱蛋白后，再用乙醚循环脱脂48h，制成牛脱蛋白骨。将脱蛋白骨环氧乙烷消毒后，于常温下保存备用。脱蛋白骨胶原染色显示其内含有部分胶原纤维，X线衍射分析结果：脱蛋白松质骨分子式为 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ，扫描电镜显示其内含密集微孔结构，微孔直径约200μm。

1.3 实验器械仪器

烤箱	上海市跃进农场医疗器械厂
光学显微镜	日本
切片机	LEICA RM2145（德国）
X线摄影机	SHIMADZU 日本岛津
双能X线骨密度仪	Osteosys EXA-3000（韩国）
CO ₂ 恒温培养箱	美国 SHEL LJB 公司

实验材料

电热恒温水槽	DK-450B（上海森信仪器公司）
超净工作台	Class II(新加坡 Airstream 公司)
冰箱	Electrolux-BCD-252T（伊莱克斯公司）
台式离心机	TGL-16B(上海安亭科学仪器厂)
pH 计	828（美国奥立龙 Orion）
超声波清洗器	SK8210HP（KUDOS）
电子天平	BS200S-WE（北京塞多利斯天平公司）
96 孔酶标仪	Model-680（美国 Bio-RAD 公司）
恒温磁力搅拌器	85-1（国华电器有限公司）
自动电热压力蒸汽灭菌器	LDZX-40BI（上海申安医疗器械厂）
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A（上海精宏设备有限公司）
超低温冰箱	DF8514（美国 SIM 公司）
低速离心机	TGL-16B（飞鸽牌）
倒置显微镜	AE20（MOTIC）
扫描电镜（SEM）	LEO1530（德国里奥电镜有限公司）
培养皿	Corning
细胞培养板	Corning
Eppendoff 管	上海生物工程技术公司
离心管	Falcon
微孔可调移液枪	芬兰 Finn timer 公司
微孔滤膜	上海市新亚净化器厂
一次性微孔过滤器	Millipore
血球计数板	上海医用光学仪器厂
手术器械	一七五医院动物实验室
牙科磨钻	解放军第一七五医院口腔科
手术器械	解放军第一七五医院骨外科

实验材料

生物力学测试仪	MTS858 Minneapolis MN (美国)
96 孔酶标仪	Model-680 (美国 Bio-RAD 公司)
自动电热压力蒸汽灭菌器	LDZX-40BI (上海申安医疗器械厂)

1.4 实验药品试剂

DMEM/F-12 培养基	Hyclone
胎牛血清	Gibco
胰蛋白酶	AMRESCO
双抗 (青霉素和链霉素)	Gibco
CRP ELISA 试剂盒	Alpha
结晶紫	Sigma
二甲基亚砜 (DMSO)	Sigma
噻唑蓝 (MTT)	AMRESCO
氯化钠 (分析纯)	广东汕头新宁化工厂
氯化钾 (分析纯)	广东汕头新宁化工厂
磷酸二氢钾 (分析纯)	广东汕头新宁化工厂
磷酸氢二钠 (分析纯)	广东汕头新宁化工厂
对硝基苯磷酸二钠 (PNPP)	Sigma
2-氨基-2-甲基-1-丙醇 (AMP)	ACROS
酶免骨钙素	美国 ADL
Triton X-100	AMRESCO
超纯水	厦门大学物理微机电中心
酒精	解放军第一七五医院制剂科
碘伏	解放军第一七五医院制剂科
戊巴比妥钠	上海生物工程有限公司
青霉素钠	上海先锋药业有限公司

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库